

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-000172

(43)Date of publication of application : 06.01.1999

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C07K 14/335
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 15/09
C12R 1:225)
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12P 21/02
C12R 1:19)

(21)Application number : 09-169563

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO
LTD

(22)Date of filing : 11.06.1997

(72)Inventor : NAKAJIMA HAJIME
DOSAKO SHUNICHI
W N CORNINGS
B PALLMANN

(54) DNA, VECTOR AND MICROORGANISM CONTAINING GENE OF PEPTIDE-TRANSPORTING PROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a DNA that has high heat stability and is useful for production of peptide-transporting protein that can specifically take in di- and tri- peptide by incorporating the gene of the peptide-transporting protein originating from *Lactobacillus helveticus* into the vector.

SOLUTION: The gene of a peptide-transporting protein originating from *Lactobacillus helveticus* as *Lactobacillus helveticus* SBT-2171 (FERM P-14381) or a peptide-transporting protein gene that is obtained by cleaving the chromosomal gene of *Lactobacillus helveticus* with a restriction enzyme *Hpa* I is included. This DNA is incorporated into a vector, a microorganism is transformed with this vector and cultured. Then, the resultant peptide-transporting protein is added to prepare membrane vesicles.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

*** NOTICES ***

JPO and NCIPJ are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) DNA containing the peptide transporter protein gene of the origin.

[Claim 2] *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) DNA containing the peptide transporter protein gene obtained by cutting a chromosomal gene with a restriction enzyme *HpaI*.

[Claim 3] *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) the DNA fragment obtained by cutting a chromosomal gene with a restriction enzyme *HpaI* — reverse PCR (inverse PCR) — DNA containing the peptide transporter protein gene which has the *EcoRV* site and *BamHI* site which are obtained by amplifying by law.

[Claim 4] *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) DNA according to claim 1 to 3 which is *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) SBT 2171 (FERM P-14381).

[Claim 5] The vector which has the peptide transporter protein production ability incorporating DNA according to claim 1 to 4.

[Claim 6] The microorganism which has the peptide transporter protein production ability which carried out the transformation by the vector according to claim 5.

[Claim 7] The membrane vesicle containing the peptide transporter protein prepared from the fungus body which the microorganism according to claim 6 was cultivated [fungus body] and made peptide transporter protein produce.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Field of the Invention] This invention relates to DNA containing the peptide transporter protein gene originating in *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) of lactic acid bacteria. Moreover, this invention relates to the vector which has the peptide transporter protein production ability incorporating this DNA. Furthermore, this invention relates to the membrane vesicle containing the peptide transporter protein prepared from the microorganism which has the peptide transporter protein production ability which carried out the transformation by this vector, and the fungus body which this microorganism was cultivated [fungus body] and made peptide transporter protein produce.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is known that a living thing will produce various transporter protein from the need of incorporating a nutrient from the outside of a living body. And various peptide transporter protein is found out until now (*Mol.Microbiol.*, vol.16, p.825, 1995). This peptide transporter protein can roughly be classified into two types according to the acquisition format of the energy source consumed on the occasion of transportation. The first type uses ATP (adenosine triphosphate) in the living body. this type of peptide transporter protein is called ABC transportation protein — the prominent total theory of Higgins is known (*Annu.Rev.Cell Biol.*, vol.8, p.67, 1992). The second type belongs to a PTR family and is Steiner. It is named (*Mol.Microbiol.*, vol.16, p.825, 1995). This peptide transporter protein performs peptide transportation using the concentration difference (proton motive force) of the proton of cell inside and outside. Although the peptide transporter protein using the proton motive force which is the second type was found out by many living things, they were [that the peptide transporter protein of the RAKUTOKOKKASU RAKUCHISU (*Lactococcus lactis*) origin is only known, and] as what originates in eukaryote and originates in a procaryote (*J.Biol.Chem.*, vol.264, p.11391, 1994). However, RAKUTOKOKKASU RAKUCHISU (*Lactococcus lactis*) Since it is mesophilic lactic acid bacteria, it is RAKUTOKOKKASU RAKUCHISU (*Lactococcus lactis*). The peptide transporter protein of the origin had the fault that it could be used only in the moderate temperature region around 30 degrees C.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] this invention persons are *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*), when research was wholeheartedly advanced about the peptide transporter protein originating in a procaryote. It found out that peptide transporter protein might be produced. Then, cloning of the gene of *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) was carried out, DNA which may produce peptide transporter protein was acquired, and it checked that the *Escherichia coli* which carried out the transformation by the vector incorporating this DNA produced the peptide transporter protein which has the property to incorporate a dipeptide and tripeptide specifically. Furthermore, it came to complete a header and this invention for the ability of a dipeptide and tripeptide to be incorporated specifically by using the membrane vesicle containing the peptide transporter protein prepared from the *Escherichia coli* which produced peptide transporter protein. Therefore, this invention is *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*). Let it be a technical problem to offer DNA containing the peptide transporter protein gene of the origin. Moreover, this

invention makes it a technical problem to offer the vector which has the peptide transporter protein production ability incorporating DNA containing the peptide transporter protein gene of the *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) origin. Furthermore, this invention makes it a technical problem to offer the microorganism which carried out the transformation by the vector which has peptide transporter protein production ability, and to offer the membrane vesicle containing the peptide transporter protein prepared from the fungus body which this microorganism was cultivated [fungus body] and made peptide transporter protein produce.

[0004]

[Means for Solving the Problem] Therefore, this invention is DNA containing the peptide transporter protein gene of the *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) origin. This invention is DNA containing the peptide transporter protein gene obtained again by cutting the chromosomal gene of *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) with a restriction enzyme *HpaI*. DNA obtained when this invention cuts the chromosomal gene of *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) with a restriction enzyme *HpaI* again — reverse PCR (inversePCR) — it is DNA containing the peptide transporter protein gene which has the *EcoRV* site and *BamHI* site which are obtained by amplifying by law. This invention is said DNA whose *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) is *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) SBT 2171 (FERM P-14381) again. This invention is a vector which has the peptide transporter protein production ability incorporating said DNA again. This invention is a microorganism which has the peptide transporter protein production ability which carried out the transformation by said vector again. This invention is a membrane vesicle containing the peptide transporter protein prepared from the fungus body which said microorganism was cultivated [fungus body] and made peptide transporter protein produce again.

[0005] Hereafter, this invention is explained in detail. DNA containing the peptide transporter protein gene of the *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) origin of this invention is *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) acquired by Delley's and others approach (Appl.Environ.Microbiol., vol.56, p.1967, 1990) etc. It can obtain by cutting a chromosomal gene with a restriction enzyme *HpaI*. In addition, specifically in this invention, *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) is *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) SBT 2171 (FERM P-14381). Furthermore, DNA containing the peptide transporter protein gene which has an *EcoRV* site and a *BamHI* site can be obtained by amplifying DNA obtained by doing in this way by the reverse PCR method. Such DNA is included in a vector, the vector which has peptide transporter protein production ability is obtained, further, by the obtained vector, the transformation of the microorganisms, such as *Escherichia coli* and a *Bacillus subtilis*, can be carried out, and the microorganism to which the production ability of peptide transporter protein was given can be obtained.

[0006]

[Embodiment of the Invention] The peptide transporter protein of the *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) origin of this invention has the property which tackles a dipeptide and tripeptide specifically. Therefore, the membrane vesicle containing the peptide transporter protein prepared from the microorganism which carried out the transformation by the plasmid which has the peptide transporter protein production ability which included DNA of this invention in the vector, and the fungus body which these microorganisms were cultivated [fungus body] and made peptide transporter protein produce can be used as peptide transporter protein. For example, the membrane vesicle which took out and prepared the membrane component from the fungus body of these microorganisms itself and the fungus body can be used for the support for condensing a peptide, a dipeptide, and tripeptide specifically, the sensor which detects a dipeptide and tripeptide specifically. *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) Since it is the lactic acid bacteria of the thermophylic, the peptide transporter protein of this invention originating in this has the description that the pyrosphere around 50 degrees C can also be used. in addition, approach (Poolman et al., Handbook of Biomembrane, 1992) which used ion inclination when a membrane vesicle was used as peptide transporter protein The approach (Driessen et al., Proc.Natl.Acad.Sci., vol.82, p.7555, 1985) of uniting with the cytochrome C oxidase of the nocardia muscle origin etc. — it is good to use it, combining a proton motive force generation method suitably.

[0007]

[Example] Next, an example and the example of a trial are shown and this invention is explained in more detail.

According to the approach (Appl.Environ.Microbiol.vol.56, pp.1967-1970, 1970) of the preparation Delley of the chromosomal gene of example 1 (a) *Lactobacillus helveticus*, the chromosomal gene of *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) was prepared. Namely, *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 (FERM P-14381) (*Lactobacillus helveticus*) By the MRS culture medium, the MRS culture medium was inoculated 5% and 37-degree C 37 degrees C were cultivated for 5 hours, after cultivating for 16 hours. After a 100mM phosphate buffer solution (pH7.0) washes the obtained culture twice, centrifugal separation is performed and fungus bodies are collected, and it is 1mMEDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). It suspended in included 10mM tris buffers (pH 7.8). Next, actuation for destroying a fungus body was performed. That is, concentration Protease K (Boehringer Mannheim make) so that concentration may become fungus body suspension in ml and 250microg / After having added Protease E (Seikagaku make), respectively so that it might become in ml and 500microg /, and performing 37 degrees C and processing for 30 minutes, 10mM tris buffers (pH 7.8) containing 1mM EDTA washed, and the processing fungus body was suspended in this buffer solution. After adding MUTANO lysine (Seikagaku make) 160U to this processing fungus body suspension and performing 37 degrees C and processing for 30 minutes to it, concentration Concentration EDTA so that it may become 0.1% and concentration may serve as 75mM(s) in SDS (sodium lauryl sulfate) Protease K was added, respectively so that it might become in ml and 200microg /, and 65 degrees C and processing of 2 hours were performed. And the organic solvent (phenol: chloroform =1:1) washed the fungus body suspension which performed the above-mentioned processing 3 times, and after separating liquids with this organic solvent and collecting water layers, the sterilization toothpick rolled round and recovered the chromosomal gene from the settlings which added and generated cold ethanol so that the last concentration might become 70% in this water layer.

(b) *Lactobacillus helveticus* SBT 2171 (FERM P-14381) of ***** of DNA containing a peptide transport protein gene (*Lactobacillus helveticus*) About the chromosomal gene, the restriction enzyme HpaI performed 37 degrees C and decomposition of 6 hours, and DNA containing a peptide transporter protein gene was obtained.

[0008] DNA containing an example 2 (magnification of DNA) peptide transporter protein gene was amplified by the reverse PCR method. That is, DNA obtained in the example 1 was combined by T-four-DNA ligase (Boehringer Mannheim make), and it considered as the circular DNA, and considered as the mold for magnification. In addition, the presentation shown in Table 1 performed magnification of DNA.

[0009]

[Table 1]

50microg [/ml] DNA fragment solution 2microl 10 time PCR buffer solution (Boehringer Mannheim make) 10microl 5mM dNTP mix (Boehringer Mannheim make) 4microl 100mM Magnesium chloride 2microl Primer 1 2microl Primer 2 2microl Sterilized water 77microl ————— Primer 1:5' - TCCTGTAATTGTTTTATTG (the EcoRV site is introduced)

Primer 2:5' - ATGACACATTATTCATACTG (the BamHI site is introduced)

[0010] Next, PWO polymerase (Boehringer Mannheim make) 1microl It adds. The reaction process of the following (1) - (5): (1) 95 degree C, 10 minutes, and (2) 95 degree C, 90 seconds, and (3) By the repeat of 30 cycles of (5) and (2) to (4), DNA was amplified and DNA containing a peptide transporter protein gene was obtained for (4) 72 degree C and 3 minutes for 50 degree C and 2 minutes. The amino acid sequence presumed from the base sequence of this DNA and its base sequence is shown in drawing 1 - drawing 3, and the array number 1 of an array table. In addition, just before starting a reaction, multistory [of the sterilization mineral oil] was carried out, and evapotranspiration of moisture was prevented.

[0011] DNA containing the peptide transporter protein gene by which example 3 (preparation of vector) magnification was carried out was combined with the vector. That is, mixed DNA obtained in the vector pTAQI for *Escherichia coli* (product made from Gencor) beforehand cut with restriction enzymes BamHI and EcoRV, and the example 2, it was made to join together by DNA ligase (Boehringer Mannheim make), and the vector which has the peptide transporter protein production

ability incorporating DNA containing a peptide transporter protein gene was obtained.

[0012] The transformation of a microorganism was performed using the vector which has example 4 (transformation of microorganism) peptide transporter protein production ability. Namely, *Escherichia coli* beforehand processed with the calcium chloride The vector which has the peptide transporter protein production ability obtained in the example 3 was mixed with E1772 share (J.Bacteriol., vol.173, pp.234-244, 1991), the vector was introduced into *Escherichia coli* by 42 degrees C and the heat shock for 90 seconds, and the *Escherichia coli* which has peptide transporter protein production ability was obtained. In addition, the vector introduced into *Escherichia coli* is ampicillin. Culture medium which added ml in 100microg / (peptone 10g/l, yeast extract 5 g/l, salt 5 g/l) It chose.

[0013] The 10mMD-lactic acid was added to the *Escherichia coli* which has the peptide transporter protein production ability obtained in the example of trial 1 (measurement of the amount of dipeptide incorporation of *Escherichia coli*) example 4, and oxygen was blown into it. The prolyl alanine (Pro-Ala) which carried out the label by ^{14}C is added after 1 minute, a sample is extracted with time, and it is a membrane filter. (0.45 micrometers) The trap of the *Escherichia coli* was carried out. And after the 0.1M lithium chloride which ice-cooled this filter washed twice, the filter was dissolved in the liquid scintillation cocktail, radioactivity was measured, and the amount of dipeptide incorporation of *Escherichia coli* was calculated. Moreover, the trial with the same said of the *Escherichia coli* which carried out the transformation by the vector which has the peptide transporter protein production ability which incorporated as contrast the *Escherichia coli* which has not carried out a transformation, and the DNA fragment of RAKUTOKOKKASU RAKUCHISU (*Lactococcus lactis*) prepared by the same approach as an example 4 was performed. A result is shown in drawing 4. As for the *Escherichia coli* which has not carried out a transformation, from the result shown in drawing 4, the amount of dipeptide incorporation did not almost have a very low increment with time, either. Moreover, the *Escherichia coli* introduced in DNA of *Lactobacillus helveticus* (*Lactobacillus helveticus*) of this invention became clear [that the amount of dipeptide incorporation is very high] from the *Escherichia coli* introduced in DNA of RAKUTOKOKKASU RAKUCHISU (*Lactococcus lactis*).

[0014] The *Escherichia coli* which has the peptide transporter protein production ability obtained in the example 5 (preparation of a membrane vesicle) example 4 was cultivated, and the membrane vesicle was prepared from the fungus body which made peptide transporter protein produce. That is, by M9 culture medium (M9 salt mix solution 200 ml/l, 20% glucose solution 20 ml/l which consist of disodium hydrogenphosphate 64 g/l, potassium-dihydrogenphosphate 15 g/l, sodium chloride 2.5 g/l, and ammonium-chloride 5.0 g/l) which added a 10g [/l.] yeast extract and the 10g [/l.] sodium succinate, after cultivating for 3 hours, the harvest of the 37 degrees C of the cultures was washed and carried out with the potassium phosphate buffer solution (pH 7.0). And according to the approach (Methods of Enzymology, vol.22, pp.99-120, 1971) of Kaback, the membrane vesicle which contains peptide transporter protein from this *Escherichia coli* was prepared. In addition, the prepared membrane vesicle was saved in liquid nitrogen, until just before using it for each trial.

[0015] To the suspension of the membrane vesicle containing the peptide transporter protein obtained in the example of trial 2 (measurement of the amount of dipeptide incorporation of a membrane vesicle) example 5, the last concentration is 50microM. The phenazine methosulfate was added so that it might become, air was blown, and it held at 30 degrees C. And after 1 minute, an ascorbic-acid potassium is added so that the last concentration may serve as 10mM(s), Pro-Ala which carried out the label by ^{14}C is further added after 1 minute, a sample is extracted with time, and it is a membrane filter. (0.45 micrometers) The trap of the *Escherichia coli* was carried out. After the 0.1M lithium chloride which ice-cooled this filter washed twice, the filter was dissolved in the liquid scintillation cocktail, radioactivity was measured, and the amount of dipeptide incorporation of a membrane vesicle was calculated. Moreover, the trial with the same said of the membrane vesicle prepared as contrast from the *Escherichia coli* which has not carried out a transformation was performed. A result is shown in drawing 5. Although the membrane vesicle prepared from the *Escherichia coli* which has not carried out a transformation had the amount of incorporation of a dipeptide lower than the result shown in drawing 5 and there was also almost no change with time, the membrane vesicle of this invention became clear [that the amount of incorporation of a dipeptide is very high]. Furthermore, the amount of dipeptide incorporation of the membrane vesicle of this

invention was measured in 37 degrees C and 45 degrees C. A result is shown in drawing 6 . From drawing 6 , it became clear activity was still higher rather than the membrane vesicle of this invention was able to be set at 37 degrees C in a 45-degree C pyrosphere.

[0016]

[Effect of the Invention] Since it has the property to incorporate a dipeptide and tripeptide specifically, the peptide transporter protein produced by the microorganism which carried out the transformation by the vector incorporating DNA containing the peptide transporter protein gene of this invention has the good absorptivity in an intestinal tract, and in case the dipeptide and tripeptide which are said for use effectiveness to be high are condensed, it can be used. Moreover, these can also be made into the sensor used in case a dipeptide and tripeptide are detected. Its thermal stability is high, and since especially the peptide transporter protein produced by this invention has activity also in the pyrosphere which is about 50 degrees C, it is useful as the concentration equipment connected to the proteolysis system said for the enzyme reaction in an elevated temperature to be required on-line, or the sensor section.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The amino acid sequence presumed from the base sequence of DNA containing the peptide transporter protein production gene obtained in the example 2 and its base sequence is shown.

[Drawing 2] A continuation [the amino acid sequence presumed from the base sequence of DNA containing the peptide transporter protein production gene obtained in the example 2 and its base sequence] of **[drawing 1]** is shown.

[Drawing 3] A continuation [the amino acid sequence presumed from the base sequence of DNA containing the peptide transporter protein production gene obtained in the example 2 and its base sequence] of **[drawing 2]** is shown.

[Drawing 4] It is the graph which shows the amount of dipeptide incorporation of the Escherichia coli in the example 1 of a trial.

[Drawing 5] It is the graph which shows the amount of dipeptide incorporation of the membrane vesicle in the example 2 of a trial.

[Drawing 6] It is the graph which shows the amount of dipeptide incorporation in 37 degrees C of the membrane vesicle in the example 2 of a trial, and 45 degrees C.

[Layout Table]

Array number: 1

The die length of an array: 1884

The mold of an array: Nucleic acid

The number of chains: Double strand

Topology: The shape of a straight chain

The class of array: Genomic DNA

Origin

Living-thing name: Lactobacillus helveticus

Stock name: SBT 2171

Array

AAGATGGACG TTAAGGTCAT CGAAAGCAAG GTTAACTTGA TCGAAGCTGA AAAAGATGCT -121
 GTTAATGATG CAGTTGCTAA AGCAATTGAT TAAGTAATAT AAAGTAATAA AAATAAGGAT -61
 CTATCTGTAA ATAGGATAGG TCCTTATTTT TCGTGGTGTA ATTGTTTTTA TTGCTTACCT -1
 TAGATAAGAA AGGAGTTTTT CTTTGGGTAA ACGAGTTCAA ATACAGCATT CTTTGGACAG 60
 CCAAAGGGCT TGTCCACTTT ATTCTTCACT GAAATGTGGG AGCGTTTCAG TTACTIONGCG 120
 ATG CGG GCT ATC TTA TTA TTC TAC 144

Met Arg Ala Ile Leu Leu Phe Tyr

1 5

ATG TAT TAC GCA GTT ACC AAA GGT GGT TTG GGG ATG TCT CAA ACT ACT 192

Met Tyr Tyr Ala Val Thr Lys Gly Gly Leu Gly Met Ser Gln Thr Thr

10 15 20

GCT GCT TCA ATC ATG TCG ATC TAT GGT TCG CTT GTT TAT TTA TCA ACA 240

Ala Ala Ser Ile Met Ser Ile Tyr Gly Ser Leu Val Tyr Leu Ser Thr

25 30 35 40

CTA GTT GGA GGC TGG CTT TCT GAC AGA GTA TGG GGC TCT AGA AAA ACA 288
Leu Val Gly Gly Trp Leu Ser Asp Arg Val Trp Gly Ser Arg Lys Thr
45 50 55
GTC TTC TAC GGC GGT GTG CTT ATT ATG TTG GGA CAC ATC GTT TTG GCT 336
Val Phe Tyr Gly Gly Val Leu Ile Met Leu Gly His Ile Val Leu Ala
60 65 70
TTG CCA GCT GGT GTA ACG GTG CTA TAC AGG TCG ATT GCT TTA ATC GTT 384
Leu Pro Ala Gly Val Thr Val Leu Tyr Arg Ser Ile Ala Leu Ile Val
75 80 85
GTA GGT ACT GGA TTA TTA AAG CCG AAC GTA TCC GAT ATG GTT GGG GGT 432
Val Gly Thr Gly Leu Leu Lys Pro Asn Val Ser Asp Met Val Gly Gly
90 95 100
CTT TAT TCG GTT GAA GAT CCC CGT CGT GAC GCT GGT TTC AGT ATT TTT 480
Leu Tyr Ser Val Glu Asp Pro Arg Arg Asp Ala Gly Phe Ser Ile Phe
105 110 115 120
GTT TTC GGG ATT AAC TTA GGC TCA ATT ATT GCT CCA TGG CTT GTA CCA 528
Val Phe Gly Ile Asn Leu Gly Ser Ile Ile Ala Pro Trp Leu Val Pro
125 130 135
TGG GCA GCT CAG GGC TTC GGT GTC CAT ATT TTT GGT AGC CAA TTG AAC 576
Trp Ala Ala Gln Gly Phe Gly Val His Ile Phe Gly Ser Gln Leu Asn
140 145 150
TTC CAT GCA GGA TTC TCA TTA GCT GCA GTT GGT ATG TTC TTT GGT TTA 624
Phe His Ala Gly Phe Ser Leu Ala Ala Val Gly Met Phe Phe Gly Leu
155 160 165
GTA CAA TAT GTA CTT GGT GGT AAA AAA TAC TTA TCA ACT GAA AGT CTG 672
Val Gln Tyr Val Leu Gly Gly Lys Lys Tyr Leu Ser Thr Glu Ser Leu
170 175 180
ACA CCT AAT GAT CCT ATT GAT AAA GGC GAT TTG CTT AAT GTG ATC AAG 720
Thr Pro Asn Asp Pro Ile Asp Lys Gly Asp Leu Leu Asn Val Ile Lys
185 190 195 200
TGG GTT GTC ATT ATT ATC ATC GCA ATT GTT GCA ATT TTA GCC GCT ATG 768
Trp Val Val Ile Ile Ile Ala Ile Val Ala Ile Leu Ala Ala Met
205 210 215
GCA GGA GTA GGG CAA TTA AGC GTT GAT AAT GTA ATT ACC TTA TTA ACT 816
Ala Gly Val Gly Gln Leu Ser Val Asp Asn Val Ile Thr Leu Leu Thr
220 225 230
ATT TTG GCG ATT GCA TTG CCA ATC TAC TAC TTC GTG ATG ATG TTT CGC 864
Ile Leu Ala Ile Ala Leu Pro Ile Tyr Tyr Phe Val Met Met Phe Arg
235 240 245
AGC TCA AAG GTT ACT AAG ATT GAG TTA GGA ATT CAT TTA CTA CCT GTA 912
Ser Ser Lys Val Thr Lys Ile Glu Leu Gly Ile His Leu Lue Pro Val
250 255 260
AGC TTG AAG AAT CGG CTG TTT TTC AAA AAA GGA TAT AAG CGG CTT AAG 960
Ser Leu Lys Asn Arg Leu Phe Phe Lys Lys Gly Tyr Lys Arg Leu Lys
265 270 275 280
CAG ATA ATT CAG CTT GAA CTT GCC ATA AAA AGG CAA AGC TTT ATT ATT 1008
Gln Ile Ile Gln Leu Glu Leu Ala Ile Lys Arg Gln Ser Phe Ile Ile
285 290 295
CTG ATA GCG CTC ATC ATC ATG GCC AGC ATT TTG ATT CCA AAC AAA GTG 1056
Leu Ile Ala Leu Ile Ile Met Ala Ser Ile Leu Ile Pro Asn Lys Val
300 305 310
ATC ATT GCC AAA CAT CTG CTC AAG CTG GTT TTG TTG GTG TTC TAT TGG 1104
Ile Ile Ala Lys His Leu Leu Lys Leu Val Leu Leu Val Phe Tyr Trp
315 320 325

ATA GGT CTT AAT TTG ATC CCT TTT AGC ACA TTT GTT CTC TCC TTT CTT 1152
Ile Gly Leu Asn Leu Ile Pro Phe Ser Thr Phe Val Leu Ser Phe Leu
330 335 340

TTT TTA GAT TAT ATC AAA CAT ATG TTT AAG AAA GAG GGG GAA CAA GCA 1200
Phe Leu Asn Tyr Ile Lys His Met Phe Lys Lys Glu Gly Glu Gln Ala
345 350 355 360

AAA AAA ACA AAA GAA AAA AGC CGG ATT CAT CAC GGG ATT GAA ATC CCG 1248
Lys Lys Thr Lys Glu Lys Ser Arg Ile His His Gly Ile Glu Ile Pro
365 370 375

TTG TTT CTC CGG CAA TTA ATC ATA AAT ATA TTC ACC CTA ATA ATT TTG 1296
Leu Phe Leu Arg Gln Leu Ile Ile Asn Ile Phe Thr Leu Ile Ile Leu
380 385 390

GAA GGC GAA ACG CTT TTT GAT GAA AAT GGG GTA GAG GTC AAT ATT GCT 1344
Glu Gly Glu Thr Leu Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Asn Ile Ala
395 400 405

GAA CAT CCA GTG CAA GGA TAT ACG GAA TTG AAT ATC AAC CTT TTG AAT 1392
Glu His Pro Val Gln Gly Tyr Thr Glu Leu Asn Ile Asn Leu Leu Asn
410 415 420

AAA GAT AGC ATT GAT TTG TGG GCT GAT TGG ATT CAA AGC GTT GCA AAA 1440
Lys Asp Ser Ile Asp Leu Trp Ala Asp Trp Ile Gln Ser Val Ala Lys
425 430 435 440

TAT TTG CTT AAT ATC ATG TAT ACG GCA GAT GTG ATC GTA ATA ATT ATT 1488
Tyr Leu Lue Asn Ile Met Tyr Thr Ala Asp Val Ile Val Ile Ile Ile
445 450 455

TTC TAC CTC GTG AAG ATG GCG GCA TTG TGG TGG GCA TGG TCG TAT ATA 1536
Phe Tyr Leu Val Lys Met Ala Ala Leu Trp Trp Ala Trp Ser Tyr Ile
460 465 470

CCG TTG AGT ACA GTA TTT GTA GGC TAT AAA TAC TCA GGT AAA GAT GAG 1584
Pro Leu Ser Thr Val Phe Val Gly Tyr Lys Tyr Ser Gly Lys Asp Glu
475 480 485

TCC TTG CAA GCT GCT TTA GAA GTT TTA TGATAATGGA TCAAAGATTG 1631
Ser Leu Gln Ala Ala Leu Glu Val Leu
490 495

AATTAAAAAA CCTTCTCGCA ATGAGAAGGT TTTTCGTTAG AATTCAGTAT GAATAATGTC 1691
ATCTTCTGGA CGATGTGCTT GG 1703

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-172

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/335		C 0 7 K 14/335	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
# (C 1 2 N 15/09	Z N A		

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-169563	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22) 出願日	平成9年(1997) 6月11日	(72) 発明者	中島 肇 埼玉県坂戸市仲町16-1-202
		(72) 発明者	登道 俊一 埼玉県浦和市北浦和5-15-39-616
		(72) 発明者	ダブリュー エヌ コーニングス オランダ国ハーレン市ケールクラーン13 フローニンゲン大学微生物学部内
		(72) 発明者	ビー パールマン オランダ国ハーレン市ケールクラーン13 フローニンゲン大学微生物学部内
		(74) 代理人	弁理士 村山 みどり

(54) 【発明の名称】 ペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNA、ベクター及び微生物

(57) 【要約】

【解決手段】 ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 由来のペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNA。前記DNAを組み込んだペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクター。前記ベクターで形質転換したペプチド輸送タンパク質産生能を有する微生物及びそれを培養してペプチド輸送タンパク質を産生させた菌体から調製したペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞。

【効果】 本発明のベクターで形質転換した微生物により産生されるペプチド輸送タンパク質は、ジペプチド及びトリペプチドを特異的に取り込む性質を有し、しかも、熱安定性が高く、高温域においても使用することができる。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 由来のペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNA。

【請求項2】 ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) の染色体遺伝子を制限酵素HpaIで切断することにより得られるペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNA。

【請求項3】 ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) の染色体遺伝子を制限酵素HpaIで切断することにより得られるDNA断片を、逆PCR (inverse PCR) 法で増幅することにより得られるEcoRVサイト及びBamHIサイトを有するペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNA。

【請求項4】 ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) が、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT 2171 (FERM P-14381) である請求項1～3のいずれかに記載のDNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載のDNAを組み込んだペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクター。

【請求項6】 請求項5に記載のベクターで形質転換したペプチド輸送タンパク質産生能を有する微生物。

【請求項7】 請求項6に記載の微生物を培養してペプチド輸送タンパク質を産生させた菌体から調製したペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、乳酸菌のラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) に由来するペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAに関する。また、本発明は、このDNAを組み込んだペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターに関する。さらに、本発明は、このベクターで形質転換したペプチド輸送タンパク質産生能を有する微生物、この微生物を培養してペプチド輸送タンパク質を産生させた菌体から調製したペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞に関する。

【0002】

【従来の技術】生物は、生体外から栄養源を取り込む必要性から、様々な輸送タンパク質を産生することが知られている。そして、これまでに種々のペプチド輸送タンパク質が見出されている (Mol. Microbiol., vol. 16, p. 825, 1995)。このペプチド輸送タンパク質は、輸送に際して消費されるエネルギー源の獲得形式に応じ、大きく二つのタイプに分類することができる。第一のタイプは、生体内のATP (アデノシン三リン酸) を利用するものである。このタイプのペプチド輸送タンパク質は、ABC輸送タンパクと呼ばれており、Higginsの著名な総説が知られている (Annu. Rev. Cell Biol., vol. 8, p. 6

2

7, 1992)。第二のタイプは、PTRファミリーに属するものであり、Steinerにより命名されたものである (Mol. Microbiol., vol. 16, p. 825, 1995)。このペプチド輸送タンパク質は、細胞内外のプロトンの濃度差 (プロトン駆動力) を利用してペプチド輸送を行うものである。第二のタイプであるプロトン駆動力を利用するペプチド輸送タンパク質は、多くの生物で見出されているが、それらは真核生物に由来するものであり、原核生物に由来するものとしては、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) 由来のペプチド輸送タンパク質が知られるのみであった (J. Biol. Chem., vol. 264, p. 11391, 1994)。しかし、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) は、中温性の乳酸菌であるので、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) 由来のペプチド輸送タンパク質は、30℃前後の中温域のみでしか使用することができないという欠点があった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、原核生物に由来するペプチド輸送タンパク質について、鋭意研究を進めていたところ、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) に、ペプチド輸送タンパク質を産生する可能性があることを見出した。そこで、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) の遺伝子をクローニングして、ペプチド輸送タンパク質を産生する可能性のあるDNAを取得し、このDNAを組み込んだベクターで形質転換した大腸菌が、ジペプチド及びトリペプチドを特異的に取り込む性質を有するペプチド輸送タンパク質を産生することを確認した。さらに、ペプチド輸送タンパク質を産生した大腸菌から調製されたペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞を利用することにより、ジペプチド及びトリペプチドを特異的に取り込むことができることを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 由来のペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAを提供することを課題とする。また、本発明は、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 由来のペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAを組み込んだペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターを提供することを課題とする。さらに、本発明は、ペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターで形質転換した微生物を提供し、この微生物を培養してペプチド輸送タンパク質を産生させた菌体から調製したペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞を提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】したがって、本発明は、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 由来のペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAである。本発明はまた、ラクトバチルス・ヘルベティ

(3)

カス (*Lactobacillus helveticus*) の染色体遺伝子を、制限酵素 *Hpa*I で切断することにより得られるペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAである。本発明はまた、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) の染色体遺伝子を制限酵素 *Hpa*I で切断することにより得られるDNAを、逆PCR (inversePCR) 法で増幅することにより得られる *EcoRV* サイト及び *Bam*HI サイトを有するペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAである。本発明はまた、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) が、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT 2171 (FERM P-14381) である前記DNAである。本発明はまた、前記DNAを組み込んだペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターである。本発明はまた、前記ベクターで形質転換したペプチド輸送タンパク質産生能を有する微生物である。本発明はまた、前記微生物を培養してペプチド輸送タンパク質を産生させた菌体から調製したペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞である。

【0005】以下、本発明について、詳しく説明する。本発明のラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 由来のペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAは、Delleyらの方法 (Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, p. 1967, 1990) 等で取得したラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) の染色体遺伝子を制限酵素 *Hpa*I で切断することにより得ることができる。なお、本発明において、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) は、具体的には、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT 2171 (FERM P-14381) である。さらに、このようにして得られたDNAを、逆PCR法により増幅することにより、*EcoRV* サイト及び *Bam*HI サイトを有するペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAを得ることができる。これらのDNAをベクターに組み込んで、ペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターを得、さらに、得られたベクターで、大腸菌、枯草菌等の微生物を形質転換して、ペプチド輸送タンパク質の産生能が付与された微生物を得ることができる。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明のラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) 由来のペプチド輸送タンパク質は、ジペプチド及びトリペプチドを特異的に取り組む性質を有する。従って、本発明のDNAをベクターに組み込んだペプチド輸送タンパク質産生能を有するプラスミドで形質転換した微生物や、これらの微生物を培養してペプチド輸送タンパク質を産生させた菌体から調製したペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞は、ペプチド輸送タンパク質として使用することができる。例えば、これらの微生物の菌体自体や、菌体から

膜成分を取り出して調製した膜小胞は、ペプチド、ジペプチド及びトリペプチドを特異的に濃縮するための担体や、ジペプチド及びトリペプチドを特異的に検出するセンサー等に利用することができる。ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) は、高温性の乳酸菌であるので、これに由来する本発明のペプチド輸送タンパク質は、50℃前後の高温域でも使用が可能であるという特徴を有する。なお、ペプチド輸送タンパク質として膜小胞を使用する場合は、イオン勾配を用いた方法 (Poolman et al., Handbook of Biomembrane, 1992) や牛心筋由来のチトクロムCオキシダーゼと融合させる方法 (Driessen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 82, p. 7555, 1985) 等、プロトン駆動力生成方法を適宜組み合わせ使用するとよい。

【0007】

【実施例】次に、実施例及び試験例を示し、本発明をさらに詳しく説明する。

実施例1

(a) ラクトバチルス・ヘルベティカスの染色体遺伝子の調製

Delleyらの方法 (Appl. Environ. Microbiol. vol. 56, p. 1967-1970, 1990) に従い、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) の染色体遺伝子を調製した。すなわち、ラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) SBT2171 (FERM P-14381) をMRS培地で37℃、16時間培養した後、5%MRS培地に接種し、37℃、5時間培養した。得られた培養物を、100mMリン酸緩衝液 (pH7.0) で2回洗浄した後、遠心分離を行って菌体を回収し、1mMEDTA (エチレンジアミン四酢酸) を含む10mMトリス緩衝液 (pH 7.8) に懸濁した。次に、菌体を破壊するための操作を行った。すなわち、菌体懸濁液に、濃度が250μg/mlとなるようにプロテアーゼK (ベーリンガー・マンハイム社製) を、濃度が500μg/mlとなるようにプロテアーゼE (生化学工業製) をそれぞれ添加して、37℃、30分の処理を行った後、1mMEDTAを含む10mMトリス緩衝液 (pH 7.8) で洗浄し、同緩衝液に処理菌体を懸濁した。この処理菌体懸濁液に、ムタノリシン (生化学工業製) 160Uを添加し、37℃、30分の処理を行った後、濃度が0.1%となるようにSDS (ラウリル硫酸ナトリウム) を、濃度が75mMとなるようにEDTAを、濃度が200μg/mlとなるようにプロテアーゼKをそれぞれ添加し、65℃、2時間の処理を行った。そして、上記の処理を行った菌体懸濁液を有機溶媒 (フェノール:クロロホルム=1:1) で3回洗浄し、同有機溶媒で分液して水層を回収した後、この水層に最終濃度が70%となるように冷エタノールを加え、生成した沈降物から滅菌楊枝で染色体遺伝子を巻き取って回収した。

(b) ペプチド輸送蛋白質遺伝子を含むDNAの調製
このラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus h*

(4)

5

elveticus) SBT 2171 (FERM P-14381) の染色体遺伝子について、制限酵素 *Hpa*I で、37℃、6時間の分解を行い、ペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAを得た。

【0008】実施例2

(DNAの増幅) ペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAを、逆PCR法により増幅した。すなわち、実施*

6

*例1で得られたDNAをT4-DNAライゲース(ペーリンガーマンハイム社製)により結合させて環状DNAとし、増幅用鋳型とした。なお、DNAの増幅は、表1に示す組成により行った。

【0009】

【表1】

DNA断片50μg/ml溶液	2μl
10倍PCR緩衝液(ペーリンガーマンハイム社製)	10μl
5mM dNTPミックス(ペーリンガーマンハイム社製)	4μl
100mM 塩化マグネシウム	2μl
プライマー1	2μl
プライマー2	2μl
滅菌水	77μl

プライマー1: 5'-TCCTGTAATTGTTTTTATTG (EcoR
Vサイトが導入されている)

プライマー2: 5'-ATGACACATTATTCATACTG (BamH
Iサイトが導入されている)

【0010】次に、PWOポリメラーゼ(ペーリンガーマンハイム社製) 1μlを加え、下記(1)~(5)の反応工程: (1) 95℃、10分、(2) 95℃、90秒、(3) 50℃、2分、(4) 72℃、3分、(5) (2)から(4)の30サイクルの繰り返しにより、DNAの増幅を行い、ペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAを得た。このDNAの塩基配列及びその塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、図1~図3及び配列表の配列番号1に示す。なお、反応を開始する直前に滅菌ミネラルオイルを重層し、水分の蒸散を防止した。

【0011】実施例3

(ベクターの調製) 増幅されたペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAをベクターに結合した。すなわち、予め制限酵素 *Bam*HI 及び *Eco*RV で切断しておいた大腸菌用ベクター pTAQI (Gencor社製) と、実施例2で得られたDNAを混合し、DNAライゲース(ペーリンガーマンハイム社製)で結合させて、ペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAを組み込んだペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターを得た。

【0012】実施例4

(微生物の形質転換) ペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターを用い、微生物の形質転換を行った。すなわち、予め塩化カルシウムで処理した大腸菌 *E1772* 株 [J. Bacteriol., vol. 173, pp. 234-244, 1991] と、実施例3で得られたペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターを混合し、42℃、90秒のヒートショックによりベクターを大腸菌に導入して、ペプチド輸送タンパク質産生能を有する大腸菌を得た。なお、大腸菌に導入したベクターは、アンピシリン 100μg/ml を添加した培地(ペプトン10g/l、酵母エキス5g/l、食塩5g/l)で選択

した。

【0013】試験例1

(大腸菌のジペプチド取り込み量の測定) 実施例4で得られたペプチド輸送タンパク質産生能を有する大腸菌に、10mM D-乳酸を添加し、酸素を吹き込んだ。1分後、¹⁴Cでラベルしたプロリルアラニン (Pro-Ala) を添加し、経時的にサンプルを採取して、メンブランフィルター (0.45μm) で大腸菌をトラップした。そして、このフィルターを氷冷した0.1M塩化リチウムで2回洗浄した後、フィルターを液体シンチレーションカクテルに溶解し、放射活性を測定して、大腸菌のジペプチド取り込み量を求めた。また、対照として、形質転換していない大腸菌と、実施例4と同様の方法により調製したラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) のDNA断片を組み込んだペプチド輸送タンパク質産生能を有するベクターで形質転換した大腸菌についても同様の試験を行った。結果を図4に示す。図4に示される結果より、形質転換していない大腸菌は、ジペプチド取り込み量が極めて低く経時的な増加もほとんどなかった。また、本発明のラクトバチルス・ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) のDNAを導入された大腸菌は、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) のDNAを導入された大腸菌よりも、ジペプチド取り込み量が非常に高いことが明らかとなった。

【0014】実施例5

(膜小胞の調製) 実施例4で得られたペプチド輸送タンパク質産生能を有する大腸菌を培養し、ペプチド輸送タンパク質を産生させた菌体から膜小胞を調製した。すなわち、酵母エキス10g/l及びコハク酸ナトリウム10g/lを添加したM9培地(リン酸水素二ナトリウム64g/l、リ

(5)

7

ン酸二水素カリウム15g/l、塩化ナトリウム2.5g/l、塩化アンモニウム5.0g/lからなるM9塩ミックス溶液(200ml/l、20%グルコース溶液20ml/l)で、37℃、3時間培養した後、培養物をリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で洗浄して、集菌した。そして、Kabackの方法(Methods of Enzymology, vol. 22, pp. 99-120, 1971)に従い、この大腸菌からペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞を調製した。なお、調製した膜小胞は、各試験に使用する直前まで液体窒素中で保存しておいた。

【0015】試験例2

(膜小胞のジペプチド取り込み量の測定) 実施例5で得られたペプチド輸送タンパク質を含有する膜小胞の懸濁液に、最終濃度が50μMとなるようにフェナジンメトサルフェートを添加し、空気を吹き込んで、30℃に保持した。そして、1分後、最終濃度が10μMとなるようにアスコルビン酸カリウムを添加し、さらに、1分後、14℃でラベルしたPro-A1aを添加し、経時的にサンプルを採取して、メンブランフィルター(0.45μm)で大腸菌をトラップした。このフィルターを氷冷した0.1M塩化リチウムで2回洗浄した後、フィルターを液体シンチレーションカクテルに溶解し、放射活性を測定して、膜小胞のジペプチド取り込み量を求めた。また、対照として、形質転換していない大腸菌から調製した膜小胞についても同様の試験を行った。結果を図5に示す。図5に示される結果より、形質転換していない大腸菌から調製した膜小胞はジペプチドの取り込み量が低く、経時変化もほとんどないが、本発明の膜小胞は、ジペプチドの取り込み量が極めて高いことが明らかとなった。さらに、本発明の膜小胞のジペプチド取り込み量を、37℃と45℃において比較した。結果を図6に示す。図6から、本発明の膜小胞は、45℃の高温域において、37℃におけるよりもさらに活性が高いことが判明した。

【0016】

【発明の効果】本発明のペプチド輸送タンパク質遺伝子を含むDNAを組み込んだベクターで形質転換した微生物により産生されるペプチド輸送タンパク質は、ジペプチド及びトリペプチドを特異的に取り込むという性質を*

8

*有するので、腸管での吸収性が良好で利用効率が高いといわれているジペプチド及びトリペプチドを濃縮する際に使用することができる。また、これらは、ジペプチド及びトリペプチドを検知する際に使用するセンサーとすることもできる。特に、本発明により産生されるペプチド輸送タンパク質は、熱安定性が高く、50℃程度の高温域においても活性を有するので、高温での酵素反応が必要であるといわれているタンパク質分解システムにオンラインで接続した濃縮装置やセンサー部として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2で得られたペプチド輸送タンパク質産生遺伝子を含むDNAの塩基配列及びその塩基配列から推定されるアミノ酸配列を示す。

【図2】実施例2で得られたペプチド輸送タンパク質産生遺伝子を含むDNAの塩基配列及びその塩基配列から推定されるアミノ酸配列の、図1の続きを示す。

【図3】実施例2で得られたペプチド輸送タンパク質産生遺伝子を含むDNAの塩基配列及びその塩基配列から推定されるアミノ酸配列の、図2の続きを示す。

【図4】試験例1における大腸菌のジペプチド取り込み量を示すグラフである。

【図5】試験例2における膜小胞のジペプチド取り込み量を示すグラフである。

【図6】試験例2における膜小胞の37℃及び45℃におけるジペプチド取り込み量を示すグラフである。

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1884

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: Lactobacillus helveticus

株名: SBT 2171

配列

```

AAGATGGACG TTAAGGTCAT CGAAGCAAG GTTAACTTGA TCGAAGCTGA AAAAGATGCT -121
GTTAATGATG CAGTTGCTAA AGCAATTGAT TAAGTAATAT AAAGTAATAA AAATAAGGAT -61
CTATCTGTAA ATAGGATAGG TCCTTATTTT TCGTGGTGTA ATTGTTTTTA TTGCTTACCT -1
TAGATAAGAA AGGAGTTTTT CTTTGGGTAA ACGAGTTCAA ATACAGCATT CTTTGGACAG 60
CCAAAGGGCT TGTCACCTTT ATTCTTCACT GAAATGTGGG AGCGTTTCAG TTAACACGGC 120
ATG CGG GCT ATC TTA TTA TTC TAC 144
Met Arg Ala Ile Leu Leu Phe Tyr
1 5
ATG TAT TAC GCA GTT ACC AAA GGT GGT TTG GGG ATG TCT CAA ACT ACT 192
Met Tyr Tyr Ala Val Thr Lys Gly Gly Leu Gly Met Ser Gln Thr Thr
10 15 20
GCT GCT TCA ATC ATG TCG ATC TAT GGT TCG CTT GTT TAT TTA TCA ACA 240

```


(6)

9	10
Ala Ala Ser Ile Met Ser Ile Tyr Gly Ser Leu Val Tyr Leu Ser Thr	
25 30 35 40	
CTA GTT GGA GGC TGG CTT TCT GAC AGA GTA TGG GGC TCT AGA AAA ACA	288
Leu Val Gly Gly Trp Leu Ser Asp Arg Val Trp Gly Ser Arg Lys Thr	
45 50 55	
GTC TTC TAC GGC GGT GTG CTT ATT ATG TTG GGA CAC ATC GTT TTG GCT	336
Val Phe Tyr Gly Gly Val Leu Ile Met Leu Gly His Ile Val Leu Ala	
60 65 70	
TTG CCA GCT GGT GTA ACG GTG CTA TAC AGG TCG ATT GCT TTA ATC GTT	384
Leu Pro Ala Gly Val Thr Val Leu Tyr Arg Ser Ile Ala Leu Ile Val	
75 80 85	
GTA GGT ACT GGA TTA TTA AAG CCG AAC GTA TCC GAT ATG GTT GGG GGT	432
Val Gly Thr Gly Leu Leu Lys Pro Asn Val Ser Asp Met Val Gly Gly	
90 95 100	
CTT TAT TCG GTT GAA GAT CCC CGT CGT GAC GCT GGT TTC AGT ATT TTT	480
Leu Tyr Ser Val Glu Asp Pro Arg Arg Asp Ala Gly Phe Ser Ile Phe	
105 110 115 120	
GTT TTC GGG ATT AAC TTA GGC TCA ATT ATT GCT CCA TGG CTT GTA CCA	528
Val Phe Gly Ile Asn Leu Gly Ser Ile Ile Ala Pro Trp Leu Val Pro	
125 130 135	
TGG GCA GCT CAG GGC TTC GGT GTC CAT ATT TTT GGT AGC CAA TTG AAC	576
Trp Ala Ala Gln Gly Phe Gly Val His Ile Phe Gly Ser Gln Leu Asn	
140 145 150	
TTC CAT GCA GGA TTC TCA TTA GCT GCA GTT GGT ATG TTC TTT GGT TTA	624
Phe His Ala Gly Phe Ser Leu Ala Ala Val Gly Met Phe Phe Gly Leu	
155 160 165	
GTA CAA TAT GTA CTT GGT GGT AAA AAA TAC TTA TCA ACT GAA AGT CTG	672
Val Gln Tyr Val Leu Gly Gly Lys Lys Tyr Leu Ser Thr Glu Ser Leu	
170 175 180	
ACA CCT AAT GAT CCT ATT GAT AAA GGC GAT TTG CTT AAT GTG ATC AAG	720
Thr Pro Asn Asp Pro Ile Asp Lys Gly Asp Leu Leu Asn Val Ile Lys	
185 190 195 200	
TGG GTT GTC ATT ATT ATC ATC GCA ATT GTT GCA ATT TTA GCC GCT ATG	768
Trp Val Val Ile Ile Ile Ala Ile Val Ala Ile Leu Ala Ala Met	
205 210 215	
GCA GGA GTA GGG CAA TTA AGC GTT GAT AAT GTA ATT ACC TTA TTA ACT	816
Ala Gly Val Gly Gln Leu Ser Val Asp Asn Val Ile Thr Leu Leu Thr	
220 225 230	
ATT TTG GCG ATT GCA TTG CCA ATC TAC TAC TTC GTG ATG ATG TTT CGC	864
Ile Leu Ala Ile Ala Leu Pro Ile Tyr Tyr Phe Val Met Met Phe Arg	
235 240 245	
AGC TCA AAG GTT ACT AAG ATT GAG TTA GGA ATT CAT TTA CTA CCT GTA	912
Ser Ser Lys Val Thr Lys Ile Glu Leu Gly Ile His Leu Lue Pro Val	
250 255 260	
AGC TTG AAG AAT CGG CTG TTT TTC AAA AAA GGA TAT AAG CGG CTT AAG	960
Ser Leu Lys Asn Arg Leu Phe Phe Lys Lys Gly Tyr Lys Arg Leu Lys	
265 270 275 280	
CAG ATA ATT CAG CTT GAA CTT GCC ATA AAA AGG CAA AGC TTT ATT ATT	1008
Gln Ile Ile Gln Leu Glu Leu Ala Ile Lys Arg Gln Ser Phe Ile Ile	
285 290 295	

(7)

11	12
CTG ATA GCG CTC ATC ATC ATG GCC AGC ATT TTG ATT CCA AAC AAA GTG	1056
Leu Ile Ala Leu Ile Ile Met Ala Ser Ile Leu Ile Pro Asn Lys Val	
300 305 310	
ATC ATT GCC AAA CAT CTG CTC AAG CTG GTT TTG TTG GTG TTC TAT TGG	1104
Ile Ile Ala Lys His Leu Leu Lys Leu Val Leu Leu Val Phe Tyr Trp	
315 320 325	
ATA GGT CTT AAT TTG ATC CCT TTT AGC ACA TTT GTT CTC TCC TTT CTT	1152
Ile Gly Leu Asn Leu Ile Pro Phe Ser Thr Phe Val Leu Ser Phe Leu	
330 335 340	
TTT TTA GAT TAT ATC AAA CAT ATG TTT AAG AAA GAG GGG GAA CAA GCA	1200
Phe Leu Asn Tyr Ile Lys His Met Phe Lys Lys Glu Gly Glu Glu Ala	
345 350 355 360	
AAA AAA ACA AAA GAA AAA AGC CGG ATT CAT CAC GGG ATT GAA ATC CCG	1248
Lys Lys Thr Lys Glu Lys Ser Arg Ile His His Gly Ile Glu Ile Pro	
365 370 375	
TTG TTT CTC CGG CAA TTA ATC ATA AAT ATA TTC ACC CTA ATA ATT TTG	1296
Leu Phe Leu Arg Glu Leu Ile Ile Asn Ile Phe Thr Leu Ile Ile Leu	
380 385 390	
GAA GGC GAA ACG CTT TTT GAT GAA AAT GGG GTA GAG GTC AAT ATT GCT	1344
Glu Gly Glu Thr Leu Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Asn Ile Ala	
395 400 405	
GAA CAT CCA GTG CAA GGA TAT ACG GAA TTG AAT ATC AAC CTT TTG AAT	1392
Glu His Pro Val Glu Gly Tyr Thr Glu Leu Asn Ile Asn Leu Leu Asn	
410 415 420	
AAA GAT AGC ATT GAT TTG TGG GCT GAT TGG ATT CAA AGC GTT GCA AAA	1440
Lys Asp Ser Ile Asp Leu Trp Ala Asp Trp Ile Glu Ser Val Ala Lys	
425 430 435 440	
TAT TTG CTT AAT ATC ATG TAT ACG GCA GAT GTG ATC GTA ATA ATT ATT	1488
Tyr Leu Lue Asn Ile Met Tyr Thr Ala Asp Val Ile Val Ile Ile Ile	
445 450 455	
TTC TAC CTC GTG AAG ATG GCG GCA TTG TGG TGG GCA TGG TCG TAT ATA	1536
Phe Tyr Leu Val Lys Met Ala Ala Leu Trp Trp Ala Trp Ser Tyr Ile	
460 465 470	
CCG TTG AGT ACA GTA TTT GTA GGC TAT AAA TAC TCA GGT AAA GAT GAG	1584
Pro Leu Ser Thr Val Phe Val Gly Tyr Lys Tyr Ser Gly Lys Asp Glu	
475 480 485	
TCC TTG CAA GCT GCT TTA GAA GTT TTA TGATAATGGA TCAAAGATTG	1631
Ser Leu Glu Ala Ala Leu Glu Val Leu	
490 495	
AATIAAAAAA CCTTCTCGCA ATGAGAAGGT TTTTCGTIAG AATTCAGIAT GAATAATGTC	1691
ATCTTCTGGA CGATGTGCTT GG	1703

(8)

【図1】

HpaI

AAGATGGACGTTAAGGTCATCGAAAGCAAGGTTAACTTCGATCGAAGCTGAAAAAGATGCT -121
 K M D V K V . I E S X V N L I E A E K D A

GTTAATGATGCAGTTGCTAAAGCAATTGATTAAGTAATATAAAGTAATAAATAAAGGAT -61
 V N D A V A K A I D stop
 ---PepN

CTATCTGTAAATAGGATAGGTCCTTATTTTTCGTGGTGTAAATGTTTTTATTGCTTACCT -1
 TAGATAAGAAAGGAGTTTTTCTTTGGGTAAAGAGTTCAATACAGCATTCTTTGGACAG 60
 -35

CCAAAGGGCTTGTCCACTTTTATTCCTCACTGAAATGTGGGAGCGTTTCAGTTACTACGGC 120
 -10 RBS

ATCGGGCTATCTTATTAATCTACATGTATTACCGAGTTACCAAAGGTGGTTTGGGGATG 180
 M R A I L L F Y M Y Y A V T K G G L G M
 --DcpI, TMS I

TCACAACTACTGCTGCTTCAATCATGTGATCTATGGTTGCTTGTATTATTATCAACA 240
 S Q T T A A S I M S I Y G S L V Y L S T
 TMS II

CTAGTTGGAGGCTGGCTTTCTGACAGAGTATGGGGCTCTAGAAAAACAGTCTTCTACGGC 300
 L V G G W L S D R V W G S R X T V F Y G
 TMS III

GGTGTGCTTATTATGTGTGGGACACATCGTTTTGGCTTTGCCAGCTGGTGTAAACGGTGCTA 360
 G V L I M L G H I V L A L P A G V T V L

TACAGGTCGATTGCTTTAATCGTTGTAGGTACTGGATTATTAAAGCCGAACGTATCCGAT 420
 Y R S I A L I V V G T G L L K P N V S D
 TMS IV

ATGGTTGGGGGCTTTTATTCGGTTGAAGATCCCGCTCGTGAAGCTGCTTTTCAGTATTTTT 480
 M V G G L Y S V E D P R R D A G F S I F
 TMS V

GTTTTGGGATTAACTTAGGCTCAATTATTGCTCCATGGCTTGTACCATGGGCAGCTCAG 540
 V F G I N L G S I I A P W L V P W A A Q

(9)

[図2]

GCCTTCGGTCTCCATATTTTGGTAGCCAATTGAACTTCCATGCAGGATCTCATTAGCT 600
 G F G V H I F G S Q L N F H A G F S L A
 TMS VI

GCAGTTGGTATGTTCTTTGGTTAGTACAATATGTAAGTGGTAAATACTTATCA 660
 A V G M F F G L V Q Y V L G G K K Y L S

ACTGAAAGTCTGACACCTAATGATCCTATTGATAAAGGCGATTGCTTAATGTGATCAAG 720
 T E S L T P N D P I D K G D L L N V I K
 TMS VII

TGGCTTGTCTATATTATCATCGCAATTGTTGCAATTTAGCGCTATGGCAGGAGTAGGG 780
 W V V I I I I A I V A I L A A M A G V G

CAATTAAGCGTTGATAATGTAATTACCTTATTAACTATTTTGGCGATTGCATTGCCAATC 840
 Q L S V D N V I T L L T I L A I A L P I
 TMS VIII

TACTACTTCGTGATGATGTTTCGCAGCTCAAAGGTTACTAAGATTGAGTTAGCAATTCAT 900
 Y Y F V M M F R S S K V T X I E L G I H

TTACTACCTGTAGCTTGAAGAATCGGCTGTTTTTCAAAAAGGATATAAGCGGCTTAAG 960
 L L P V S L K N R L F F K K G Y K R L K

CAGATAATTCAGCTTGAAGCTTGCATATAAAAGGCAAGCTTTATTATTCTGATAGCGCTC 1020
 Q I I Q L E L A I K R Q S F I I L I A L
 TMS IX

ATCATCATGGCAGCATTTTGATTCCAAACAAAGTGATCATTGCCAAACATCTGCTCAAG 1080
 I I M A S I L I P N K V I I A K H L L K

CTGGTTTGTGGTGTTCATGGATAGGTCTTAATTGATCCCTTTTAGCAATTTGTT 1140
 L V L L V F Y W I G L N L I P F S T F V
 TMS X

CTCTCCTTCTTTTTTTAGATTATATCAACATATGTTTAAAGAAGAGGGGGAACAAGCA 1200
 L S F L F L D Y I K H M F K K E G E Q A

(10)

【図3】

AAAAAACAAAGAAAAAGCCGGATTCATCAGGGGATTGAAATCCCGTTGTTTCTCCGG K K T K E K S R I H H G I E I P L F L R TMS ^{VI}	1260
CAATTAATCATAAATATATTCAACCTAATAATTTTGGAGGCGAAACGCTTTTGTATGAA Q L I I N I F T L I I L E G E T L F D E	1320
AATGGGGTAGAGGTCAATATTGCTGAACATCCAGTGCAAGGATATACGGAATTGAATATC N G V E V N I A E H P V Q G Y T E L N I	1380
AACCTTTTGAATAAAGATAGCATTGATTGTGGGCTGATTGGATTCAAACGGTTGCAAAA N L L N K D S I D L W A D W I Q S V A K	1440
TATTTCCTTAATATCATGTATACGGCAGATGTGATCGTAATAATTATTTTCTACCTCGTG Y L L N I M Y T A D V I V I I I F Y L V TMS ^{VI}	1500
AAGATGCCCGCATTTGCTGGCGCATGCTCGTATATACCGTTGAGTACACTATTTCAGGC X M A A L W W A W S Y I P L S T V F V G	1560
TATAAATACTCAGGTAAAGATGAGTCCTTGCAAGCTGCTTTAGAAGTTTATGATAATGG Y K Y S G K D E S L Q A A L E V L - -	1620
ATCAAAGATTGAATTAAAAAOCCTTCTCGCAATGAGAAGGTTTTCGTTAGAATTTCAGTA TGAATAATGTCATCTTCTGAGCATGTGCTTGG	1680

アンダーライン：仮想プロモーター領域（-35及び-10）及びリボソーム

結合位置（RBS）

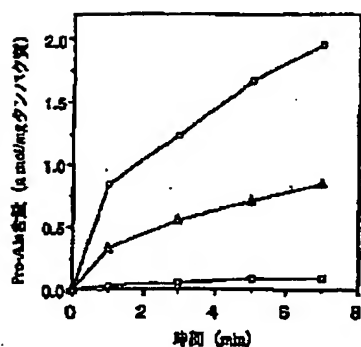
矢印付き点線：仮想ターミネーター配列

TMS：トランスメンブランスパン位置

(11)

【図4】

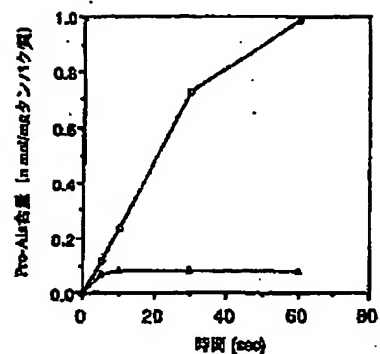
大腸菌のジペプチド取り込み量



- 形質転換していない大腸菌
○ *Lactobacillus helveticus* の遺伝子を含む大腸菌
△ *Lactococcus lactis* の遺伝子を含む大腸菌

【図5】

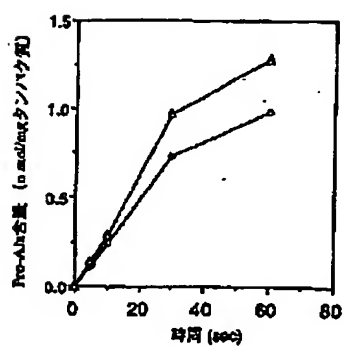
膜小胞のジペプチド取り込み量



- 形質転換した大腸菌から得た膜小胞
△ 形質転換していない大腸菌から得た膜小胞

【図6】

膜小胞のジペプチド取り込み量



- 37℃における取り込み量
△ 45℃における取り込み量

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F I

C 1 2 R 1:225)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.